

**Sveučilište u Zagrebu**  
**Prehrambeno-biotehnološki fakultet**  
**Preddiplomski studij Biotehnologija**

**Nina Čuljak**

7007/BT

**KOMPETITIVNA EKSKLUZIJA BAKTERIJAMA MLIJEČNE  
KISELINE**

ZAVRŠNI RAD

**Predmet: Biotehnologija 4**

**Mentor: doc.dr.sc. *Ksenija Uroić***

**Zagreb, 2017.**

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Preddiplomski studij Biotehnologija  
Zavod za biokemijsko inženjerstvo  
Laboratorij za tehnologiju antibiotika, enzima,  
probiotika i starter kultura

### KOMPETITIVNA EKSKLUZIJA BAKTERIJAMA MLIJEČNE KISELINE

Nina Čuljak, 7007/BT

**Sažetak:** Integritet crijevne barijere je preduvjet za pravilno funkcioniranje sluznice crijeva, koja je odgovorna za povećanje kapaciteta apsorpcije bez narušavanja efikasnih obrambenih mehanizama uslijed kemijskih i mikrobioloških izazova. Sve je više dokaza da je poremećaj integriteta epitelne barijere jedan od glavnih uzročnih faktora koji se mogu povezati sa nekolicinom gastrointestinalnih bolesti, uključujući infekciju patogenima, pretilost, dijabetes, upalnu bolest crijeva, sindrom iritabilnog crijeva i nekrotizirajući enterokolitis. Sve je više dokaza da probiotički sojevi bakterija mliječne kiseline (BMK) mogu utjecati na integritet crijevne barijere, zbog čega su veoma aktualna istraživanja u kojima se *in vitro* eksperimentima na staničnim linijama, ispitivanjima na pokusnim životinjama te kliničkim istraživanjima ispituje može li se probioticima postići vraćanje homeostaze te ozdravljenje osobe kod koje se primjenjuju. Među potencijalnim probiotičkim sojevima BMK ističu se vrste roda *Lactobacillus*, posebno oni sojevi koji na površini stanica ekspimiraju sloj specifičnih S-proteina. U ovom radu ispitana je sposobnost obnavljanja sloja S-proteina soja *Lactobacillus brevis* SF9B nakon prolaska kroz gastrointestinalni trakt te uloga S-proteina u kompetitivnoj ekskluziji bakterija *Listeria monocytogenes* ATCC 19111 i *Staphylococcus aureus* 3048 istim probiotičkim sojem u *in vitro* eksperimentima adhezije na crijevne epitelne stanice Caco-2 stanične linije.

**Ključne riječi:** Caco-2 stanice, kompetitivna ekskluzija, *Lactobacillus brevis* SF9B, S-proteini

**Rad sadrži:** 32 stranice, 7 slika, 2 tablice, 51 literaturni navod

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici**

**Prehrambenobiotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb**

**Mentor:** doc.dr.sc. Ksenija Uroić

**Pomoć pri izradi:** dr.sc. Andreja Leboš Pavunc, mag.ing. Katarina Zorić, mag.ing. Martina Banić

**Datum obrane:** srpanj, 2017.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

University of Zagreb  
Faculty of Food Technology and Biotechnology  
Undergraduate studies Biotechnology  
Department of Biochemical Engineering  
Laboratory for Antibiotic, Enzyme,  
Probiotic and Starter Cultures Technology

### COMPETITIVE EXCLUSION WITH LACTIC ACID BACTERIA

Nina Čuljak, 7007/BT

**Abstract:** Intestinal barrier integrity is a prerequisite for homeostasis of mucosal function, which is responsible for increasing absorptive capacity without disturbing efficient defensive reactions against chemical and microbial challenges. Evidence is mounting that disruption of epithelial barrier integrity is one of the major aetiological factors associated with several gastrointestinal diseases, including pathogen infection, obesity, diabetes, inflammatory bowel disease, irritable bowel syndrome and necrotising enterocolitis. However, there are indications that probiotic strains of lactic acid bacteria (LAB) can positively affect intestinal barrier integrity, which led to increased intensity of researches in which *in vitro* cell lines, animal models and clinical trials assess whether probiotics, when applied in people, can revert to homeostasis and health. Among potential probiotic strains of LAB, species of the genus *Lactobacillus* stand out, especially strains which express layer of specific S-proteins on the cell surface. In this work, the ability of probiotic strain *Lactobacillus brevis* SF9B to regenerate the layer of S-protein after exposure of the cells to stimulated conditions of gastrointestinal tract was examined. The role of S-protein in competitive exclusion of bacteria *Listeria monocytogenes* ATCC 19111 and *Staphylococcus aureus* 3048 with the same probiotic strain in *in vitro* experiments using intestinal epithelial cells of Caco-2 cell line was also tested.

**Keywords:** Caco-2 cells , competitive exclusion, *Lactobacillus brevis* SF9B, S-proteins

**Thesis contains:** 32 pages, 7 figures, 2 tables, 51 references

**Original in:** Croatian

**Thesis is in printed and electronic form deposited in the library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb**

**Mentor:** Ksenija Uroić, PhD

**Technical support and assistance:** Andreja Leboš Pavunc, PhD; Katarina Zorić, MSc; Martina Banić, MSc

**Defence date:** June 2017

# Sadržaj

1. UVOD .....	1
2. TEORIJSKI DIO.....	2
2.1. Gastrointestinalni trakt ljudi .....	2
2.2. Bakterije mliječne kiseline .....	3
2.3. Probiotici.....	4
2.3.1. Mehanizmi djelovanja probiotika .....	5
2.3.2. Značaj probiotika za ljude .....	8
2.4. Uloga S-proteina u probiotičkoj aktivnosti Lactobacillus vrsta .....	9
3. MATERIJALI I METODE .....	12
3.1. MATERIJALI .....	12
3.1.1. Radni mikroorganizmi .....	12
3.1.2. Stanične linije .....	12
3.1.3. Hranjive podloge.....	12
3.1.4. Kemikalije.....	13
3.1.5. Aparatura i pribor .....	14
3.2. METODE RADA .....	15
3.2.1. Održavanje i čuvanje mikroorganizama i staničnih linija .....	15
3.2.2. Uklanjanje S-proteina s površine bakterijskog soja.....	15
3.2.3. Priprema simuliranog želučanog soka i simuliranog soka tankog crijeva.....	16
3.2.4. Obnavljanje S-proteina nakon prolaska kroz gastrointestinalni trakt .....	16
3.2.5. Izolacija površinskih proteina.....	17
3.2.6. SDS-PAGE elektroforeza .....	17
3.2.7. Adhezija na Caco-2 stanice i kompetitivna ekskluzija .....	18
4. REZULTATI I RASPRAVA .....	21
4.1. Obnavljanje S-proteina nakon prolaska kroz gastrointestinalni trakt.....	21
4.2. Kompetitivna ekskluzija s predinkubacijom bakterije mliječne kiseline Lb. brevis SF9B .....	24
5. ZAKLJUČCI .....	27
6. LITERATURA .....	28

# 1. UVOD

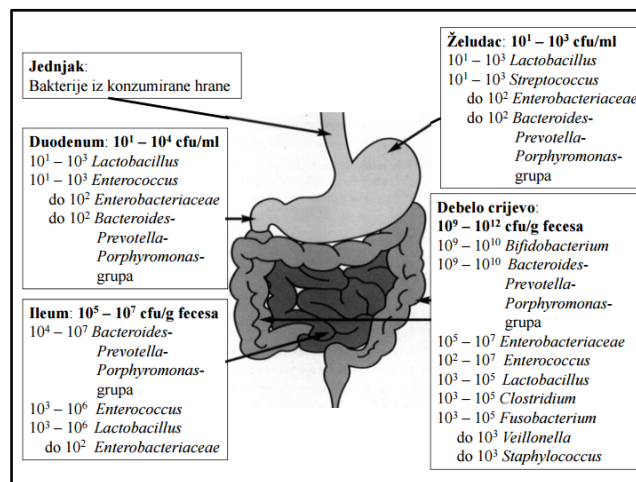
Probiotici su se kroz povijest definirali na različite načine, no prema njihovoj aktualnoj definiciji, koju je dala radna skupina za evaluaciju probiotika u hrani (FAO/WHO, 2002), probiotici su „živi mikroorganizmi koji, kada se primjene u odgovarajućim količinama, djeluju korisno na zdravlje domaćina“. Da bi se neki mikroorganizam mogao primijeniti kao probiotik, mora zadovoljiti vrlo stroge probiotičke kriterije (Šušković, 1996; Šušković i sur., 2001; Šušković i sur., 2010). Uz preživljavanje u gastrointestinalnom traktu, gdje prepreku čine niski pH želuca, enzimi probavnog sustava i žučne soli u tankom crijevu, glavni izborni kriterij u izboru potencijalnih probiotika je uspješnost ispitivanih bakterijskih sojeva u agregaciji i adheziji na crijevni epitel te kompetitivnoj ekskluziji (Kos, 2001). U navedenim kriterijima, najveći značaj ima površina bakterijskih stanica probiotičkih sojeva. Naime, molekule na površini stanice, kao što su lecitin, lipoteihonska kiselina i proteini, u interakciji su s različitim receptorima u intestinalnom tkivu (Kleerebezem i sur., 2010; Hynönen i Palva, 2013). Pritom se posebno ističu površinski S-proteini (eng. Surface-layer proteins), koji čine omotač oko pojedinih Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija te *Arhea* (Sleytr i sur., 2014). Unutar BMK, S-proteini su pronađeni u samo nekoliko od 113 različitih *Lactobacillus* vrsta, kod kojih čine čak i do 20% ukupnih staničnih proteina. Unatoč zajedničkim svojstvima svih S-proteina *Lactobacillus* vrsta, kao što su molekularna masa od 25 do 71 kDa, visoka bazičnost te najčešće neglikolizirani oblik, visoka stabilnost i otpornost prema mnogim nepovoljnim uvjetima te stvaranje nekovalentnih veza s površinom stanice (Sara i Sleytr, 2000; Mobili i sur., 2010), smatra se da im biološka funkcija nije zajednička, već da je specifična unutar roda ili grupe mikroorganizama koji se nalaze u istom okolišu.

Soj *Lactobacillus brevis* SF9B jedan je od 5 sojeva sa slojem S-proteina izoliranih u Laboratoriju za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu koji eksprimiraju na površini stanica sloj S-proteina te imaju probiotičko djelovanje. Stoga je cilj ovog rada bio je ispitati važnost S-proteina soja *L. brevis* SF9B u preživljavanju uvjeta gastrointestinalnog trakta te ispitati njegovu ulogu u kompetitivnoj ekskluziji bakterija *Listeria monocytogenes* ATCC 19111 i *Staphylococcus aureus* 3048 istim sojem u *in vitro* eksperimentima adhezije na crijevne epitelne stanice Caco-2 stanične linije.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. Gastrointestinalni trakt ljudi

Ljudski gastrointestinalni trakt sastoji se od nekoliko povezanih organa koji su uključeni u razgradnju nutrijenata kojom se osigurava energija. Od usta do debelog crijeva nalazi se kompleksna mikrobiota koja se sastoji od fakultativnih i striktnih anaeroba (Zoetendal i sur., 2008).



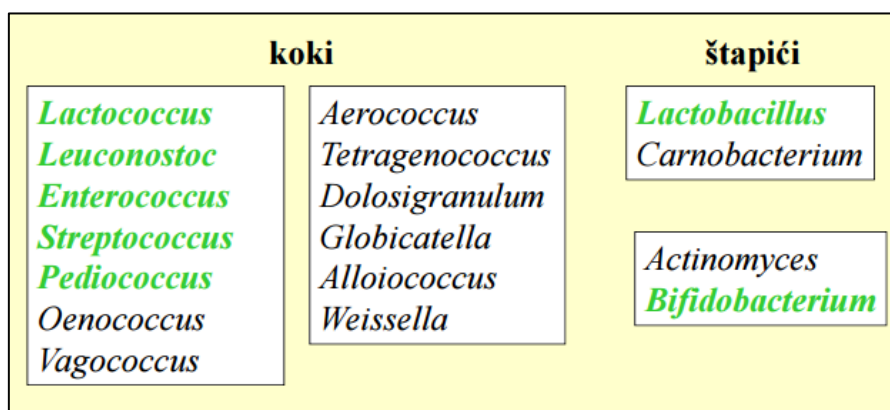
**Slika 1.** Sastav humane intestinalne mikroflore (Šušković i Kos, predavanja iz predmeta Biotehnologija 4, akad. god. 2016./2017., [http://moodle.srce.hr/2016-2017/pluginfile.php/978791/mod\\_resource/content/1/biotehnologija%204\\_2016\\_5web.pdf](http://moodle.srce.hr/2016-2017/pluginfile.php/978791/mod_resource/content/1/biotehnologija%204_2016_5web.pdf), pristupljeno 10.06.2017.)

Ljudska crijeva sadrže gustu i kompleksnu zajednicu mikroba od kojih mnogi trajno nastanjuju ovu nišu. Osim stalnih mikroorganizama, mnogobrojne bakterije privremeno prolaze kroz probavni trakt kao posljedica hranjenja. One se mogu unijeti preko fermentiranih prehrambenih proizvoda ili putem dodataka prehrani koji sadrže probiotike. Probiotici su definirani kao jedna ili više kultura živih mikroorganizama koji, primjenjeni u ljudi ili životinja, djeluju korisno na domaćina, poboljšavajući svojstva autohtone mikroflore probavnog sustava domaćina (FAO/WHO, 2002; Hill i sur., 2014). U probavnom sustavu nalazi se sloj epitelnih stanica koji predstavlja fizičku barijeru između crijevnog lumena, lamina propria i mukozalnog limfoidnog tkiva (Bron i sur., 2017). Također, sluz koju luče vrčaste stanice epitela služi kako bi prostorno razdijelila bakterije u lumenu te tako spriječila bakterijsku kolonizaciju epitela (Johansson i sur., 2011). Miševi kojima nedostaje Muc2, glavni mucin kojeg luče crijeva, spontano razvijaju kolitis, upalu debelog crijeva, dokazujući time važnost funkcije probavne

barijere (Van der Sluis, 2006). Prvi pravi dokaz o ulozi epitelnog integriteta u sprječavanju upale probavnog sustava došao je od kimernog miša kod kojega je dio epitela tankog crijeva imao eksprimiran N-kadherin umjesto E-kadherina (Hermiston i Gordon, 1995). Oni dijelovi probavnog trakta koji imaju eksprimiran N-kadherin propuštaju više od dijelova koji imaju eksprimiran E-kadherin te zbog toga razvijaju žarišne rane uzrokovane upalom. Istraživanja sa nekoliko različitih „knockout“ miševa su pokazala da poremećaji u putevima održavanja epitelnog integriteta, u odgovoru na epitelni stres ili u regulaciji imunološkog odgovora sluznice vode do razaranja barijere i kolitisa potaknutog bakterijskim antigenima i molekularnim uzorcima povezanih sa mikrobima (Bron i sur., 2017).

## 2.2. Bakterije mliječne kiseline

BMK su Gram-pozitivne, asporogene i nepokretne bakterije koje preživljavaju u anaerobnim ili fakultativno aerobnim uvjetima. Mogu biti okruglog (*cocci*) ili štapićastog (*bacilli*) oblika (Slika 2) (Quinto i sur., 2014). To su kemoorganotrofni i mezofilni mikroorganizmi koji rastu samo na kompleksnim hranjivim podlogama te imaju GRAS status (eng. Generally Regarded as Safe). Zajednička osobina im je da fermentacijom ugljikohidrata daju mliječnu kiselinu. Dijelev se na homofermentativne, mliječna kiselina je jedini proizvod fermentacije, ili heterofermentativne, uz mliječnu kiselinu nastaju i drugi produkti (CO<sub>2</sub>, propionska kiselina...).



**Slika 2.** Prikaz rodova BMK koji su okruglog oblika (koki) i štapićastog oblika (Šušćković i Kos, predavanja iz predmeta Biotehnologija 4, akad. god. 2016./2017., [http://moodle.srce.hr/2016-2017/pluginfile.php/978791/mod\\_resource/content/1/biotehnologija%204\\_2016\\_5web.pdf](http://moodle.srce.hr/2016-2017/pluginfile.php/978791/mod_resource/content/1/biotehnologija%204_2016_5web.pdf), pristupljeno 10.06.2017.)

Karakteristike onih BMK koje djeluju kao probiotici su: ljudsko porijeklo, otpornost na žučne soli i povećana kiselost, adhezija na crijevni epitel intestinalnog trakta, proizvodnja

antimikrobnih supstanci, upotreba u prehrambenoj industriji i klinička ispitanoost (Obradović, 2002/03).

Terapeutski učinci probiotičkih bakterija: bolje usvajanje laktoze kod laktozaintolerantnih osoba, sniženje kolesterola i triglicerida u krvi, uspostavljanje normalne crijevne mikroflore nakon uzimanja antibiotika, bolje usvajanje kalcija iz mlijeka, pozitivan efekt u tretmanu dijareje i jačanje imunološkog sustava (Obradović, 2002/03).

Adhezija BMK na stanice crijeva povezana je sa peristaltikom, dobrim adhezijskim kapacitetom i prisutnosti mucina koji štite i podmazuju epitelne površine (Corfield i sur., 2000). Bakterije prisutne u crijevima inhibiraju adheziju patogenih bakterija na epitelne stanice crijeva zahvaljujući njihovoj sposobnosti da proizvode mucine (Moal i Servin, 2006). *Lactobacillus plantarum* povećava nivo ekspresije mRNA nekih mucina, inhibirajući tako vezanje enteropatogene bakterije *Escherichia coli* na stanice (Mack i sur., 1999; Mack i sur., 2003).

Ograničen je broj istraživanja u kojima su se utjecaji probiotika na integritet barijere provodili na zdravim ljudima, iako je postavljeno više mogućih direktnih i indirektnih mehanizama kojima bakterije utječu na funkciju barijere. Gotteland i sur. (2001) jedni su od onih koji su istraživanja provodili na zdravim volonterima. Ispitivao se utjecaj konzumacije *Lactobacillus rhamnosus* GG na izazove koji su se nametnuli epitelnoj barijeri tretiranjem sa nesteroidnim protuupalnim lijekom indometacinom. Autori su objavili da je konzumacija živih *L. rhamnosus* GG štitila integritet želučane sluznice, ali da nije utjecala na razini crijeva. Time se htjela naglasiti razlika u fiziologiji epitelne barijere na različitim dijelovima gastrointestinalnog trakta. Karczewski i sur. (2010) su proveli bojanje čvrstih veza (eng. Tight junctions, TJ) iz uzoraka dvanaesnika dobivenih od zdravih volontera nakon perfuzije sa *Lactobacillus plantarum* WCFS1. Autori su pokazali da isti soj osigurava zaštitu protiv kemijski potaknutog poremećaja barijere koristeći *in vitro* model sa Caco-2 staničnom linijom, uključujući TRL-2 ovisan signalni put. Ova istraživanja impliciraju da su intervencije sa probioticima mogući pristup kojim bi se poboljšala funkcija epitelne barijere crijeva kod ljudi.

## 2.3. Probiotici

Probiotici su jedna ili više kultura živih mikroorganizama koji, primjenjeni u ljudi ili životinja, djeluju korisno na domaćina, poboljšavajući svojstva autohtone mikroflore probavnog sustava domaćina (Šušković, 1996; FAO/WHO, 2002).

Izraz probiotik odnosi se na proizvode koji:



- 1.sadrže žive mikroorganizme, npr. kao liofilizirane stanice ili u fermentiranim proizvodima,
- 2.poboljšavaju zdravstveno stanje ljudi i životinja (poticanje rasta životinja) i
- 3.mogu djelovati u ustima ili probavnom traktu, u gornjem respiratornom traktu ili u urogenitalnom traktu (Šušković i sur., 1997).

Kako bi se probiotici mogli koristiti kao živi lijekovi moraju zadovoljiti određene zahtjeve, koji se mogu podijeliti u 3 skupine:

1. OPĆI ZAHTJEVI – trebaju biti poznatog i odgovarajućeg podrijetla, trebaju biti zdravstveno sigurni (ne smiju biti toksični i patogeni, kao i genetički nestabilni, odnosno trebaju imati GRAS status) te trebaju imati otpornost prema niskom pH, želučanom soku, soku gušterače i žučnim solima
2. TEHNOLOŠKI ZAHTJEVI – trebaju imati sposobnost preživljavanja i zadržavanja aktivnosti tijekom priprave i skladištenja probiotičkih sojeva te imati željena organoleptička svojstva kad se koriste u fermentacijskim procesima
3. FUNKCIONALNI ZAHTJEVI – trebaju imati sposobnost adhezije i kolonizacije crijevnog epitela, antimikrobno djelovanje (posebno prema patogenim mikroorganizmima), trebaju poticati imunološki odgovor te mijenjati mikrobni metabolizam u probavnom traktu (Šušković, 1996).

### 2.3.1. Mehanizmi djelovanja probiotika

#### I. Inhibicija rasta nepoželjnih mikroorganizama

##### a) Antimikrobno djelovanje

BMK koje se primjenju kao probiotici imaju antimikrobno djelovanje te djeluju antagonistički iz više razloga. Naime, tijekom rasta i fermentacije BMK dolazi do snižavanja pH uslijed nastanka organskih kiselina kao što su mliječna i octena kiselina, a takvi su uvjeti nepogodni za rast i razmnožavanje drugi mikroorganizama. Osim toga, djelovanjem enzima NADH peroksidaze i flavoprotein oksidaze BMK sintetiziraju vodikov peroksid ( $H_2O_2$ ) koji kada se nakupi pokazuje inhibicijsko djelovanje prema *Staphylococcus aureus* i *Pseudomonas* sp. Baktericidno djelovanje vodikovog peroksida očituje se kroz oksidacijsko djelovanje na stanicu mikroorganizma i stanične proteine –  $H_2O_2$  oksidira SH-skupinu enzima aldolaze, gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaze i heksokinaze koji su ključni za normalno odvijanje metabolizma. Diacetil je još jedan od spojeva koje proizvode BMK koji, kada se nakupi, inhibicijski djeluje na veliki broj Gram-negativnih bakterija. Konačno, za antimikrobno djelovanje BMK zaslužni su i

bakteriocini. Bakteriocini su ribosomski sintetizirani antimikrobni peptidi iz bakterija djelotvorni prema sojevima iste ili srodne vrste. Bakteriocini Gram-pozitivnih mikroorganizama, odnosno bakterija mliječne kiseline, imaju inhibicijsko djelovanje prema drugim Gram-pozitivnim bakterijama. Glavni bakteriocin kojeg proizvode BMK jest nizin čiji je mikroorganizam producent *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. Nizin se koristi u biokonzerviranju hrane zbog toga što je neškodljiv dodatak hrani. Bakteriocini djeluju tako da se prvo specifično vežu na osjetljivu stanicu, zatim ulaze kroz citoplazmenu membranu, permeabiliziraju membranu i uzrokuju smrt stanice (Šušković i sur., 1997).

#### b) Kompeticija za nutrijente

Natjecanje za iskoristive ugljikohidrate iznimno je važno u reguliranju bakterijske populacije u gastrointestinalnom traktu. Freter i sur. (1983) su pokazali da je rast i razmnožavanje bakterija *Escherichia coli*, *Fusobacterium* sp. i *Eubacterium* sp. jako inhibirano kada se one inokuliraju u fekalni filtrat mišje intestinalne flore, što dovodi do zaključka da mišja intestinalna mikroflora kontrolira ekosustav autohtone kulture (Šušković i sur., 1997).

#### c) Kompeticija za mjesta adhezije

Jedno od poželjnih osobina probiotika jest sposobnost vezanja na crijevni epitel te se time natječe sa patogenima koji se također mogu vezati na epitelnu površinu crijeva. Mikroflora koja je stalno vezana na sluznicu sprječava nastanjivanje patogenih mikroorganizama (Šušković i sur., 1997). U istraživanjima (Kennedy i Volz, 1985.a; Kennedy i Volz, 1985.b) koja su se provela na hrčcima podvrgnutih i nepodvrgnutih djelovanju penicilina te nacijepljenih s kvascem *Candida albicans* dobili su se rezultati koji upućuju na to da se puno veći broj stanica kvasca vezao na crijevni epitel hrčaka tretiranih antibiotikom.

### II. Promjene metabolizma mikroorganizama u probavnom traktu

Modifikacija procesa metabolizma koji se odvijaju u probavnom traktu domaćina jedan je od najvažnijih poželjnih učinaka probiotika. Pozitivni utjecaji probiotika mogu se očitovati kroz više mehanizama, a to su:

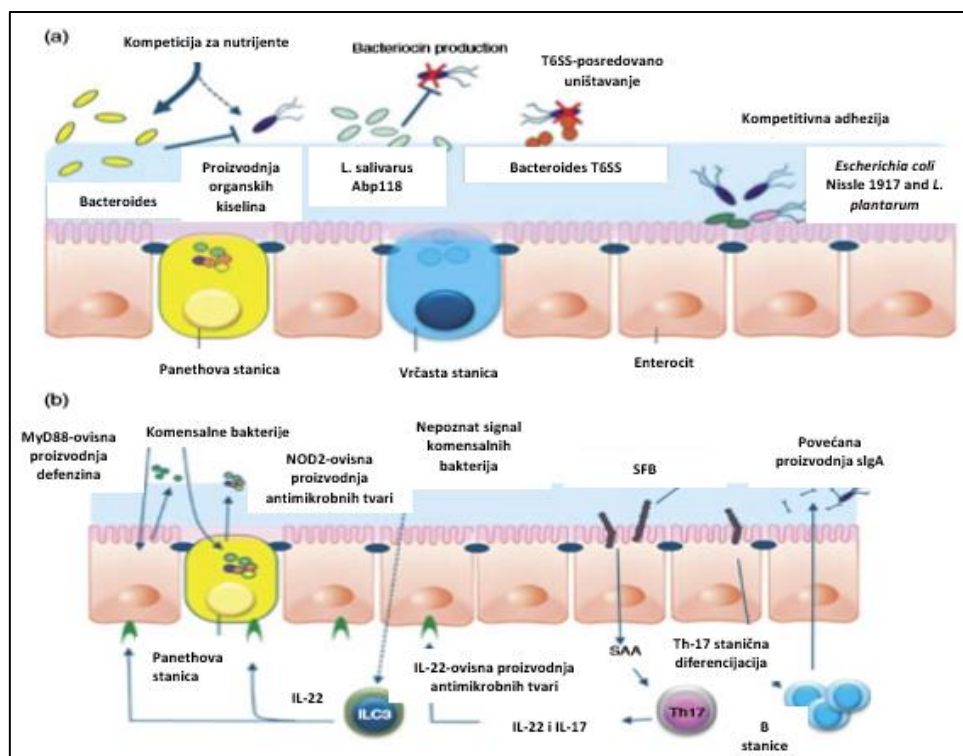
1. zaustavljanje reakcija čiji je rezultat proizvodnja toksičnih ili kancerogenih metabolita
2. stimulacija enzimskih reakcija uključenih u detoksifikaciju potencijalno toksičnih supstancija
3. stimulacija enzima sisavaca uključenih u razgradnju kompleksnih hranjivih sastojaka ili enzima koji su, nasljedno ili zbog bolesti, odsutni

4. sintetiziranje enzima i drugih esencijalnih hranjivih sastojaka koji prehranom nisu uneseni u potrebnim količinama (Šušković i sur., 1997).

Fuller (1989) i Rowland (1992) su ispitivali utjecaje probiotika na ljude te su dokazali da probiotici povoljno utječu na smanjenje aktivnosti štetnih enzima i na povećanje aktivnosti nekih korisnih enzima, primjerice da se poveća aktivnost enzima  $\beta$ -galaktozidaze u osoba s nemogućnošću metaboliziranja laktoze.

### III. Stimulacija imunološkog sustava

Imunološki odgovor kojeg pokreću probiotici može se objasniti time da BMK (ili proizvodi njihova metabolizma) uzrokuju promjene u crijevnoj mikrobnj populaciji, što posljedično izaziva promjene u imunološkom odgovoru (Šušković i sur., 1997). Prema tome, osim što djeluju na regulaciju crijevne mikroflore, probiotici mogu posredno djelovati i na pojavu bolesti u tkivima udaljenima od gastrointestinalnog trakta (Havenaar i Huis in't Veld, 1992).



**Slika 3.** Direktni i indirektni mehanizam kojim nametnici ili probiotici antagoniziraju patogene. Grafički prikaz direktnog (a) i indirektnog (b) mehanizma modulacije funkcije barijere uzrokovane bakterijskom (probiotičkom) interakcijom (Bron i sur., 2017).

### 2.3.2. Značaj probiotika za ljude

Razlog sve većeg broja istraživanja probiotika te njihove sve intenzivnije primjene u terapiji ljudi jest nastojanje da se u budućnosti smanji upotreba antibiotika, pri čemu se probiotici nameću kao alternativna antimikrobna strategija. Naime, prekomjerno korištenje antibiotika u preradarstvu i stočarstvu kao faktori rasta u krmivima, u fitopatologiji te u prehrambenoj industriji i konzerviranju, ali i neodgovorna konzumacija antibiotika za liječenje upala uzrokovanih bakterijama, mogu dovesti do pojave antibiotske rezistencije. Alarmantnom brzinom se razvijaju nove patogene bakterije koje imaju stečenu rezistenciju na postojeće antibiotike. Također, zabilježeno je toksično djelovanje nekih antibiotika na konzumenta. U takvim slučajevima preostaju nam probiotici kao obrambeni mehanizam od razvoja mnogobrojnih bolesti.

**Tablica 1.** Primjeri probiotičkih bakterija sa pozitivnim djelovanjem (Salminen i sur., 1996; Šušković i sur., 1997)

<b>VRSTA BAKTERIJE</b>	<b>PROBIOTIČKO DJELOVANJE KAO REZULTAT KLINIČKIH ISTRAŽIVANJA</b>
<i>Lactobacillus acidophilus</i> LA	Stimulira imuno sustav, veže se na crijevne stanice, regulira sastav crijevne mikroflore
<i>Lactobacillus acidophilus</i> NCFB 1748	Smanjuje aktivnost fekalnih enzima, primjenjuje se u terapiji dijareje uzrokovane radioterapijom u terapiji konstipacije
<i>Lactobacillus</i> GG (ATCC 53013)	Primjenjuje se u terapiji dijareje uzrokovane antibiotskom terapijom, rotavirusom i bakterijom <i>Clostridium difficile</i> ; za prevenciju Crohnove bolesti i kao nadomjestak cjepiva
<i>Lactobacillus casei</i> Shirota	Primjenjuje se u prevenciji crijevnih poremećaja, u terapiji dijareje uzrokovane rotavirusom; stimulira imuno sustav u ranoj fazi raka krvi i raka crijeva; regulira sastav crijevne mikroflore, smanjuje aktivnost fekalnih enzima

<i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i> ; <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	Ne djeluju na rotavirus dijareje i ne utječu na aktivnost fekalnih enzima
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	Regulira sastav crijevne mikroflore i primjenjuje se u terapiji dijareje uzrokovane rotavirusom i drugim virusima
<i>Lactobacillus gasseri</i> (ADH)	Smanjuje aktivnost fekalnih enzima, preživljava u intestinalnom traktu
<i>Lactobacillus reuteri</i>	Kolonizira intestinalni trakt (istraživanja provedena na životinjama); postoji mogućnost da postane humani probiotik

## 2.4. Uloga S-proteina u probiotičkoj aktivnosti *Lactobacillus* vrsta

S-sloj predstavlja niz kristaličnih proteinskih podjedinica koji su prisutni kao najudaljeniji dio stanične stijenke u nekoliko sojeva roda *Lactobacillus*, mnogih drugih bakterija i *Archaea*. Unatoč sličnosti u aminkoiselinskom sastavu, značajna je razlika čak i među sekvencijama S-proteina različitih laktobacila. S-proteini laktobacila se od drugih S-proteina razlikuju po maloj molekulskoj masi, najčešće oko 45 kDa, te visokoj pI vrijednosti (Åvall-Jääskeläinen i Palva, 2005). Općenito, S-proteini imaju dvije strukturne regije od kojih svaka ima esencijalnu ulogu – jedna regija sudjeluje u vezanju S-proteina na staničnu stijenku, a druga u povezivanju S-proteina u površinski sloj (Åvall-Jääskeläinen i sur., 2008). Varijabilni dio S-proteina (N-terminalni kraj proteina BMK *L. acidophilus* i *L. crispatus* te C-terminalni kraj proteina BMK *L. brevis*) odgovoran je za povezivanje monomera S-proteina u S-sloj, dok je konzervirani dio zaslužan za vezanje S-proteina na staničnu stijenku (Hynönen i Palva, 2013).

S-proteini imaju mnogo uloga, ovisno o vrsti u kojoj su prisutni, a razlikuju se čak i među sojevima pojedine vrste. Biološka uloga S-proteina još se uvijek intenzivno istražuje. dosad je utvrđeno da su pročišćeni S-proteini stabilni pri nefiziološkom pH, širokom rasponu temperatura, izloženosti radijaciji, visokom tlaku te prilikom djelovanja nekih proteolitičkih enzima te detergenata, zbog čega se smatra da imaju zaštitnu ulogu u obrani stanice od neprijatelja (Mobili i sur., 2010). Frece i sur. (2005) su u pokusima u kojima su ekstrahirali S-

proteine dokazali njegovu važnost prilikom izloženosti stanica stresnim uvjetima. Naime, tretiranjem sa kaotropnim agensom kao što je 5M litij-klorid (LiCl), ekstrahirali su S-proteine s površine stanica laktobacila koji ih eksprimira, pri čemu su stanice ispitivanog soja postale osjetljivije na djelovanje simuliranih sokova gastrointestinalnog trakta i druge okolišne uvjete. Hollman i sur. (2007) su dokazali da su S-proteini sojeva *L. brevis* i *L. kefir* učinkoviti u zaštiti liposoma te da im pružaju veću stabilnost ukoliko su izloženi djelovanju žučnih soli, ekstraktu gušterače, promjenama pH vrijednosti i temperaturnim promjenama.

Gastrointestinalni trakt sadrži epitelnu površinu koja je prekrivena sluznicom koja štiti epitelne stanice od oštećenja i patogena te osigurava prebivalište i nutrijente crijevnoj mikroflore (Toumola i sur., 1999). Ukoliko dođe do oštećenja sluznice uslijed traume ili mikrobne infekcije, bakterije mogu doći u doticaj sa bazalnom membranom i ekstracelularnim matriksom koji se nalaze ispod epitelnih stanica (Horie i sur., 2002; Tallon i sur., 2007). Različita istraživanja su dokazala da S-proteini sudjeluju u bakterijskoj agregaciji, adheziji na epitelne stanice i na crijevne strukture, kao što su sluznica i proteini ekstracelularnog matriksa. Kako bi se shvatili mehanizmi i uloge S-proteina prisutnih u laktobacila provode se brojna istraživanja sa sojevima laktobacila koji sadrže S-proteine (Horie i sur., 2002).

Agregacija se smatra jednim od načina pozitivnog doprinosa probiotika u obrani od patogenih mikroorganizama. Pojam agregacija podrazumijeva interakciju između mikroorganizama koji su genetički isti (autoagregacija) ili različiti (koagregacija). Probiotički sojevi koji imaju sposobnost agregacije sprječavaju kolonizaciju patogena tako što se, nakon agregacije, vežu na crijevni epitel i tvore barijeru (Mobili i sur., 2010). Utjecaj S-proteina na agregaciju se može ispitati na bakterijskim sojevima prije i poslije uklanjanja S-proteina. Ako se S-proteini uklone tretmanom sa 5M LiCl bitno se smanji sposobnost autoagregacije soja *L. acidophilus* M92 (Kos i sur., 2003) i *L. crispatus* ZI001 (Chen i sur., 2007) čime se može uočiti važnost S-proteina. Utvrđeno je da S-proteini nekih laktobacila mogu djelovati i kao adhezini, sudjelujući u vezanju određenih BMK na dijelove ekstracelularnog matriksa. S-proteini soja *L. brevis* OLL2772 odgovorni su za čvrsto vezanje na ljudski antigen A eksprimiran u crijevnoj sluznici, kojeg prepoznaju i neki virusni i bakterijski patogeni. Zauzimajući mjesto na koje se patogeni mogu vezati, S-proteini tog soja sudjeluju u obrani od infekcije, odnosno dolazi do kompetitivne ekskluzije patogena sojem *L. brevis* (Mobili i sur., 2010). Ukoliko se S-proteini uklone sa površine bakterijskih stanica tretmanom sa 2M gvanidin hidrokloridom (GHCi) ili 5M LiCl, značajno se smanji sposobnost adhezije soja *L. brevis* ATCC 8287 na fibronektin i laminin (Jakava-Viljanen i sur., 2002; Garrote i sur., 2004) te sojeva *L. plantarum* na sluznicu i proteine ekstracelularnog matriksa (Tallon i sur., 2007). Sposobnost adhezije na epitelne stanice

također se pripisuje prisutnosti S-proteina. Kemijsko uklanjanje S-proteina značajno je smanjilo adheziju soja *L. brevis* ATCC 8287 na Caco-2 staničnu liniju epitela ljudskih crijeva (Hynönen i sur., 2002). S-proteini koji imaju sposobnost adhezije doprinose probiotičkoj aktivnosti *Lactobacillus* vrsta tako što inhibiraju vezanje patogena na tkiva domaćina, što se postiže kompeticijom za vezna mjesta na stanicama crijeva, proteina ekstracelularnog matriksa i proteina sluznice ili blokiranjem površine kojom se patogen veže na crijeva. Pretpostavlja se da su S-proteini soja *L. crispatus* JCM 5810 odgovorni za sprječavanje adhezije patogene *E. coli* na laminin i bazalnu membranu tako što se natječu za vezna mjesta molekule laminina (Horie i sur., 2002).

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. MATERIJALI

##### 3.1.1. Radni mikroorganizmi

Soj bakterije mliječne kiseline i test-mikroorganizmi korišteni u ovom radu prikazani su u tablici 1. Sojevi su dio Zbirke mikroorganizama Laboratorija za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura Zavoda za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (ZBMK).

**Tablica 2.** Bakterijski sojevi korišteni u ovom radu uz optimalne uvjete uzgoja

Bakterijski sojevi	Oznaka soja	Hranjive podloge i uvjeti rasta
<i>Lactobacillus brevis</i>	SF9B	MRS, 37°C, anaerobno
<i>Staphylococcus aureus</i>	3048	BHI, 37°C, aerobno
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19111	BHI, 37°C, aerobno

##### 3.1.2. Stanične linije

Caco-2 stanična linija – kontinuirana stanična linija koja sadrži heterogene humane tumorske stanice kolorektalnog epitela; Caco-2 stanice su priređene u Zavodu za molekularnu medicinu Instituta Ruđer Bošković te pripremljene za provođenje eksperimenta u Laboratoriju za biologiju i genetiku mikroorganizama Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

##### 3.1.3. Hranjive podloge

U radu su korištene slijedeće podloge:

a) hranjive podloge za održavanje i uzgoj bakterije mliječne kiseline

- MRS (De Man, Rogosa i Sharpe) agar, sastava (g/l destilirane vode): pepton 10; mesni ekstrakt 10; kvašćev ekstrakt 5; glukoza 20; Tween 80 1;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,1;



MnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0,05; natrijev-acetat 5; agar 20. pH vrijednost podloge iznosi 6,5, a sterilizacija se provodi pri 121°C tijekom 15 min.

- MRS bujon je istog sastava kao podloga MRS agar, ali bez dodatka agara.

b) hranjive podloge za održavanje i uzgoj test-mikroorganizama

- BHI (Brain heart infusion) agar sastava (g/l destilirane vode): infuzije telećeg mozga i goveđeg srca i peptoni 27,7; glukoza 2; NaCl 5; puferi 2,5; agar 13. pH podloge je 7,4, a sterilizacija se provodi pri 121°C tijekom 15 minuta.
- BHI bujon je istog sastava kao podloga BHI agar, ali bez dodatka agara.

c) selektivna hranjiva podloga za izolaciju test-mikroorganizma *Staphylococcus aureus*

- BP (Baird-Parker) agar sastava (g/l destilirane vode): pepton od kazeina 10; goveđi ekstrakt 5; kvašćev ekstrakt 1; natrijev piruvat 10; litijev klorid 5; glicin 12; agar 17. pH podloge je 6,8, a sterilizacija se provodi pri 121°C tijekom 15 minuta. Nakon što se podloga ohladi na 50°C, sterilno se doda 5% emulzije telurita i žumanjka.

d) selektivna hranjiva podloga za izolaciju test-mikroorganizma *Listeria monocytogenes*

- ChromoBio® Listeria agar sastava (g/l destilirane vode): peptoni 34; glukoza 2; mineralne soli 15,5; natrijev piruvat 2; L-α-fosfatidilinositol 2; kromogeni supstrat 0,05; antibiotici 0,17; amfotericin B 0,01; puferi 3,5; agar 13. pH podloge je 6,8. 35 g podloge se resuspendira u 400 ml destilirane vode i zagrije, uz često miješanje, do vrenja. Nakon toga se provodi sterilizacija pri 121°C tijekom 15 minuta, a nakon što se podloga ohladi na 50°C, sterilno se doda 100 ml tekućeg dodatka i jedna bočica selektivnog dodatka.

e) hranjiva podloga za kultivaciju staničnih linija

- Reduced Serum Medium 1x (MEM) medij za kultivaciju Caco-2 stanične linije (Gibco)

### 3.1.4. Kemikalije

- glicerol, „Alkaloid“, Makedonija
- etanol, „Kemika“, Hrvatska
- pepsin (P-700), „Sigma“, SAD

- goveđa žuč (oxgall), „Difco“, SAD
- pankreatin (165 U/mg) iz svinjske gušterače, „BioChemika“, Fluka, Švicarska
- natrijev hidroksid, „Kemika“, Hrvatska
- fosfatni pufer, „Kemika“, Hrvatska
- glicin, „Gram-mol“, Hrvatska
- akrilamid, „Sigma“, SAD
- TEMED (N, N, N', N'-tetrametilen), „Sigma“, SAD
- β-merkaptetanol, „Sigma“, SAD
- metilensko modri R-250, „Sigma“, SAD
- izopropanol, „Kemika“, Hrvatska
- ledena octena kiselina, „Kemika“, Hrvatska
- natrijev dodecilsulfat, „Sigma“, SAD
- glicerol, „Alkaloid“, Makedonija
- Tris (hidroksimetil)-aminometan, „Carlo Erba“, Italija
- amonij-perokosodisulfat (APS), „Kemika“, Hrvatska
- kloridna kiselina, „Kemika“, Hrvatska
- natrijev klorid, „Kemika“, Hrvatska
- standard za elektroforezu proteina (molekulske mase 14-97 kDa), „Pharmacia“, SAD
- litijev klorid (LiCl), „AppliChem“, Njemačka
- tripsin, „Promega“, SAD
- Triton X, „AppliChem“, Njemačka

### 3.1.5. Aparatura i pribor

- Petrijeve zdjelice
- epruvete
- automatske pipete, „Eppendorf“, SAD
- ependorfice
- kivete za centrifugiranje; 15 ml, 50 ml
- stalci za ependorfice
- stalci za epruvete
- pinceta
- autoklav, „Sutjeska“, Jugoslavija
- termostad, „Instrumentarija“, Hrvatska

- vodena kupelj, „Sutjeska“, Jugoslavija
- vibro-mješač EV-100, „Kartell“, Italija
- vaga, „Tehtnica“, Slovenija
- magnetska mješalica, „Tehtnica“, Slovenija
- hladnjak, „Gorenje“, Slovenija
- centrifuga Centric, „Tehtnica“, Slovenija
- centrifuga s hlađenjem 5804R, „Eppendorf“, SAD
- tresilica, „New Brunswick Scientific“, SAD
- zamrzivač (-80°C), „New Brunswick Scientific“, SAD
- čitač mikrotitarskih pločica LKB 5060-006, „GDV“, Italija
- elektroforetske kadice, „Cleaver Scientific Ltd“, Velika Britanija
- igla za nanošenje proteinskih uzoraka, „Hamilton“, SAD

## 3.2. METODE RADA

### 3.2.1. Održavanje i čuvanje mikroorganizama i staničnih linija

Soj bakterije mliječne kiseline je čuvan pri -80°C u MRS tekućoj hranjivoj podlozi uz dodatak 15 % (v/v) glicerola, a test-mikroorganizmi su čuvani na -80°C u BHI bujonu s 15% (v/v) glicerola. Dan prije ekperimenta sojevi se inokuliraju u svježu hranjivu podlogu te inkubiraju pri optimalnoj temperaturi rasta prema uvjetima navedenim u tablici 1.

Stanice Caco-2 stanične linije su čuvane u MEM mediju pri 37°C u 5%-tnoj atmosferi CO<sub>2</sub>, u minimalnom esencijalnom mediju te s dodatkom 10% (v/v) toplinom inaktiviranog fetalnog goveđeg seruma.

### 3.2.2. Uklanjanje S-proteina s površine bakterijskog soja

Prekonoćna bakterijska kultura *Lb. brevis* SF9B se centrifugira pri 3500 okr/min tijekom 15 minuta i dva puta ispere sterilnom fiziološkom otopinom. Talog stanica se resuspendira u 4 ml 5M litijevog klorda i inkubira pri 37°C tijekom 1 sata. Nakon inkubacije, stanice se centrifugiraju pri 3500 okr/min tijekom 15 minuta te dva puta isperu sterilnom fiziološkom otopinom i koriste za sljedeće pokuse (3.2.4.).

### 3.2.3. Priprema simuliranog želučanog soka i simuliranog soka tankog crijeva

Simulirani želučani sok se priprema suspendiranjem pepsina (3 g/L) u 0,5% otopini natrijevog klorida, kojoj je pH podešen na 2,0 s koncentriranom kloridnom kiselinom.

Simulirani sok tankoga crijeva se priprema suspendiranjem pankreatina (1 g/L), i žučnih soli (3,0 mg/mL goveđe žuči) u 0,5% otopini natrijeva klorida, kojoj je pH podešen na 8,0 s natrijevom lužinom.

### 3.2.4. Obnavljanje S-proteina nakon prolaska kroz gastrointestinalni trakt

Preko noći je uzgojeno 40 ml soja *Lb. brevis* SF9B kojem je skinut S-sloj. Nakon centrifugiranja je talog stanica ispran i resuspendiran u 20 ml destilirane vode. Dobivena suspenzija se podijeli u 4 uzorka koji se tretiraju na sljedeći način:

uzorak 1: nakon centrifugiranja, talog resuspendirati u 8 mL PBS-a te inkubirati tijekom 2 h pri 37°C. Nakon toga stanice centrifugirati, dobiveni talog isprati i resuspendirati u 2 mL PBS-a čuvati pri +4°C.

uzorak 2: nakon centrifugiranja, talog resuspendirati u 8 mL želučanog soka, te inkubirati tijekom 2 h pri 37°C. Nakon toga stanice centrifugirati, dobiveni talog isprati i resuspendirati u 2 mL PBS-a čuvati pri +4°C.

uzorak 3: nakon centrifugiranja, talog resuspendirati u 8 mL simuliranog želučanog soka, te inkubirati tijekom 2 h pri 37°C. Nakon toga stanice centrifugirati, isprati, resuspendirati u 8 mL simuliranog soka tankog crijeva i inkubirati tijekom 2h pri 37°C, zatim stanice centrifugirati, dobiveni talog isprati i resuspendirati u 2 mL PBS-a čuvati pri +4°C.

uzorak 4: nakon centrifugiranja, talog resuspendirati u 8 mL simuliranog soka tankog crijeva, te inkubirati tijekom 2 h pri 37°C. Nakon toga stanice centrifugirati, dobiveni talog isprati i resuspendirati u 2 mL PBS-a čuvati pri +4°C.

Uzorci se centrifugiraju, a dobiveni talog stanica se resuspendira u MRS bujonu. Tako pripremljenim suspenzijama se izmjeri  $A_{620}$  u mikrotitarskim pločicama i podesi optička gustoća na OD=1. Svaka 2 h (tijekom 6 sati te 22. i 24. sat) se uzimaju uzorci i koriste dalje za izolaciju površinskih proteina.

### 3.2.5. Izolacija površinskih proteina

Pripremljeni uzorci (3.2.4.) se centrifugiraju pri 9 000 okr/min tijekom 5 minuta. Talog bakterijskih stanica se ispere dva puta s 1 ml sterilne destilirane vode, a zatim se resuspendira u 50 µl 2%-tne otopine SDS-a. Uzorke je potrebno prokuhati 10 minuta, a zatim centrifugirati 5 minuta pri 9 000 okr/min. 15 µl supernatanta, u kojem su prisutni proteini, se pomiješa s 5 µl reducirajućeg reagensa i prokuha 2-3 minute, a dobiveni uzorci se razdvajaju pomoću SDS-poliakrilamid gel elektroforeze (SDS-PAGE) prema postupku opisanom u 3.2.6.

### 3.2.6. SDS-PAGE elektroforeza

Pripremljeni uzorci se nanose na 10%-tni poliakrilamidni gel. SDS-poliakrilamidna gel elektroforeza (SDS-PAGE) se provodi u komori za elektroforezu pri konstantnom naponu od 200 V kroz 45 min. Nakon završene elektroforeze, gel se boji u otopini koja sadrži 0,02% Coomassie Brilliant Blue praha, 25% izopropanola i 10% octene kiseline, kroz najmanje 3 h. Nakon bojenja, gel je inkubiran u 10%-tnoj otopini octene kiseline do obezbojenja pozadine te nakon toga skeniran.

*Priprava 10 %-tnog poliakrilamidnog gela:*

gel za separaciju (10 %-tni)- donji gel:

Tris (hidroksimetil aminometan)-HCl pufer pH 8,8	2,5 ml
Akrlamid	2,5 ml
destilirana voda	2,5 ml
TEMED ( N,N,N',N'-tetrametiletilendiamin)	5 µl
amonijev persulfat (10 %-tni APS)	38 µl

gel za sabijanje (10 %-tni)-gornji gel:

Tris-HCl pufer pH 6,8	2,13 ml
Akrlamid	0,3 ml
TEMED	5 µl
APS (10 %-tni)	22,5 µl

*Pufer za elektroforezu (10 x koncentrat), za 1000 ml:*

30 g Tris-a  
144 g glicina  
10 g SDS-a

*Pufer za uzorke za elektroforezu (5 x konc.)-reducirajući reagens (za 25 ml):*

0,75 g Tris-a  
0,095 g EDTA  
2,5 g SDS-a (2%)  
10 ml glicerola (10%)  
0,005% bromfenol plavo  
25% β-merkaptetoetanol

### 3.2.7. Adhezija na Caco-2 stanice i kompetitivna ekskluzija

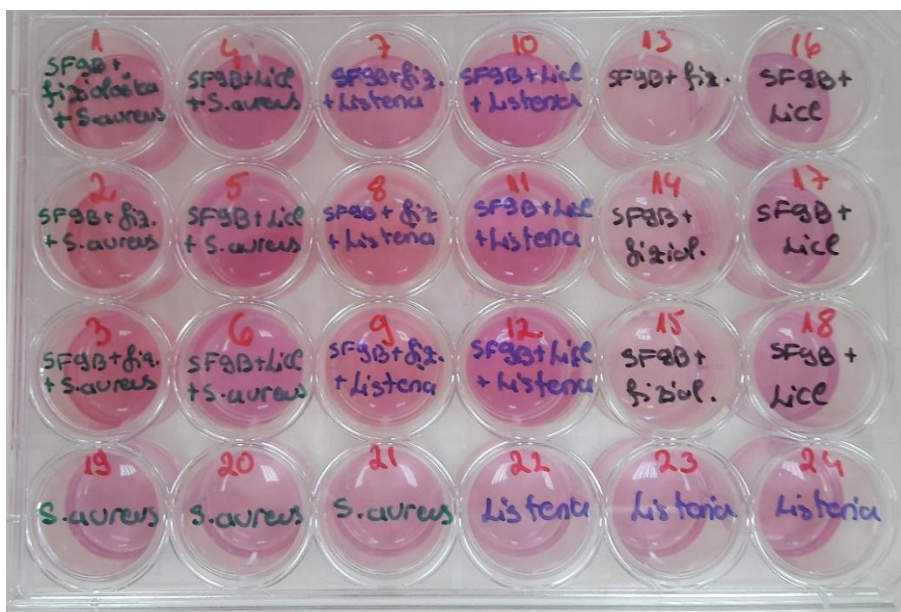
Caco-2 stanična linija je kontinuirana stanična linija koja sadrži heterogene ljudske tumorske stanice kolorektalnog epitela, prikladne za provjeru sposobnosti adhezije bakterija. Stanice Caco-2 stanične linije uzgoje se na 2 pločice s 24 jažice u Reduced Serum Medium (MEM) u T-boci volumena 25 cm<sup>3</sup> i održavaju se pri 37 °C i u 5 %-tnoj atmosferi CO<sub>2</sub>, u minimalnom esencijalnom mediju te s dodatkom 10 % (v/v) toplinom inaktiviranog fetalnog goveđeg seruma (56 °C tijekom 30 min). Stanice se inkubiraju u opisanim uvjetima i svaka dva dana im se dodaje svježi medij. Za ispitivanje adhezije bakterijskih stanica na staničnu liniju Caco-2 stanica, precijepe se Caco-2 stanice u plastične plitice s 24 jažice u koncentraciji od 1 x 10<sup>5</sup> stanica u jažici. Kako bi se dobila suspenzija Caco-2 stanica za naciepljivanje, najprije se moraju odlijepiti stanice porasle u monosloju u T-boci pomoću tripsina. Zbog α<sub>2</sub>-makroglobulina, serum u mediju ima antitripsinsku aktivnost pa se prije dodatka tripsina treba ukloniti medij. Nakon dodatka tripsina, slijedi inkubacija pri 37°C 10 min, tripsin se uklanja i dodaje se medij. Za brojanje poraslih Caco-2 stanica koristi se Bürken-Türk komorica volumena 10<sup>-4</sup> mL i izračuna se koncentracija stanica u uzorku. U staničnu suspenziju se dodaje potreban volumen medija. Tako pripremljene Caco-2 stanice se ispiru tri puta u fosfatnom puferu.

Soj bakterije mliječne kiseline, *Lactobacillus brevis* SF9B se uzgoji dva dana prije ispitivanja adhezije u 4 paralele po 5 mL MRS bujona. Prekonoćne kulture stanica se centrifugiraju 5 min pri 4200 o/min. Potom se talog ispere s 10 mL fiziološke otopine i centrifugira se 5 min. Stanice se resuspendiraju u 20 mL fiziološke otopine, podijele se na dva

dijela i centrifugiraju. Jednoj paraleli kulture stanice *Lb. brevis* SF9B se doda 5M litijev klorid za uklanjanje S-loja, a druga se resuspendira u 10 ml fiziološke otopine. Tako pripremljene kulture stanica se inkubiraju pola sata na sobnoj temperaturi na tresilici. Nakon inkubacije suspenzije se centrifugiraju, talog se ispiri s 5mL fiziološke otopine, a zatim se talog još jednom resuspendira u 5 ml fiziološke otopine. Tako pripremljenoj suspenziji se izmjeri  $A_{620}$  u mikrotitarskim pločicama. Nakon toga se suspenzija centrifugira, a talog resuspendira u MEM mediju kako bi se dobio OD=1.

Test-mikroorganizmi, *Staphylococcus aureus* 3048 i *Listeria monocytogenes* ATCC 19111 se uzgoje u BHI bujonu preko noći. Daljnja priprema test-mikroorganizama je ista kao i kod soja *Lb. brevis* SF9B bez tretmana s litijevim kloridom. Iz svih suspenzija (BMK i test-mikroorganizama) su napravljena razrijeđenja kako bi se indirektnom metodom odredio broj stanica pojedinog soja prije adhezije na Caco-2 stanice. Za određivanje broja stanica *Lb. brevis* SF9B se koristi MRS agarom. Nakon dvodnevne anaerobne inkubacije pri 37°C izbroje se porasle kolonije. Za određivanje broja stanica bakterije *Staphylococcus aureus* 3048 upotrebljava se BP agar, a za određivanje broja stanica bakterije *Listeria monocytogenes* ATCC 19111 Rapid agar pri čemu aerobna inkubacija traje 48 sati pri 37°C.

Jažice s Caco-2 epitelnim stanicama isperu se 3 puta u fosfatnom puferu te se u jažicu dodaje po 0,5 mL suspenzije bakterija mliječne kiseline *Lb. brevis* SF9B (sa i bez tretmana s litijevim kloridom) (prema shemi prikazanoj na slici 4) i stanice se inkubiraju 60 min pri 37°C. Nakon inkubacije u jažice se dodaje 0,5 mL suspenzije test-mikroorganizama (prema shemi prikazanoj na slici 4) i ponovo se inkubira 30 min pri 37°C. Jažice se nakon inkubacije ispiru 3 puta s 1 mL PBS-a kako bi se uklonile bakterijske stanice koje se nisu adhezirale te se inkubiraju 10 min u 0,05% (v/v) u otopini Triton X-100 kako bi se uništile Caco-2 stanice. Sadržaj svake jažice se prebaci u epicu i centrifugira 5 min. Potom se talog stanica resuspendira u 1 mL fosfatnog pufera u mikrotitarskim pločicama, a broj adheziranih stanica se određuje indirektnom metodom na isti način kao prije adhezije.



**Slika 4.** Shema nacijepljivanja mikrotitarske pločice

- 1, 2, 3 – tri paralele *Lb. brevis* SF9B (bez tretmana s LiCl) uz *St. aureus* 3048
- 4, 5, 6 - tri paralele *Lb. brevis* SF9B (tretman s LiCl) uz *St. aureus* 3048
- 7, 8, 9 -tri paralele *Lb. brevis* SF9B (bez tretmana s LiCl) uz *L. monocytogenes* ATCC 19111
- 10, 11, 12 - tri paralele *Lb. brevis* SF9B (tretman s LiCl) uz *L. monocytogenes* ATCC 19111
- 13, 14, 15 - tri paralele *Lb. brevis* SF9B (bez tretmana s LiCl)
- 16, 17, 18 - tri paralele *Lb. brevis* SF9B (tretman s LiCl)
- 19, 20, 21 – tri paralele *St. aureus* 3048
- 22, 23, 24 – tri paralele *L. monocytogenes* ATCC 19111



## 4. REZULTATI I RASPRAVA

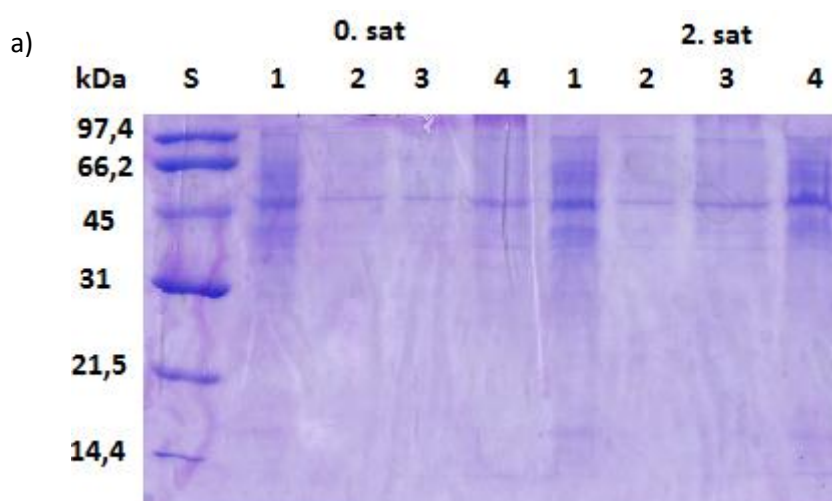
### 4.1. Obnavljanje S-proteina nakon prolaska kroz gastrointestinalni trakt

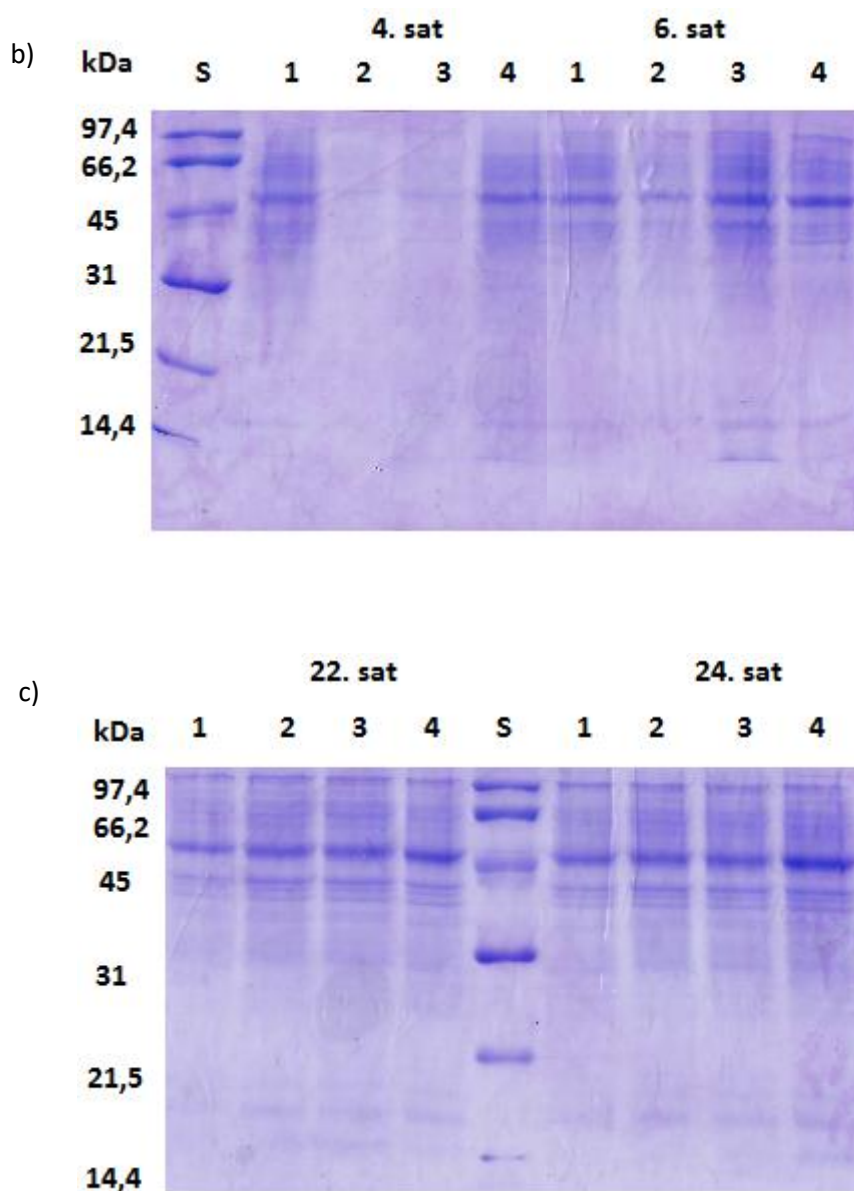
Ekspresija S-proteina kod probiotičkih sojeva kao što je *Lb. brevis* SF9B od iznimne je važnosti za iskazivanje njihovih probiotičkih svojstava. Naime, S-proteini oko stanične stijenke stanica pojedinih sojeva bakterija tvore zaštitni sloj. Različita su istraživanja potvrdila pozitivne učinke prisutnosti S-sloja (Mobili i sur., 2010). Zahvaljujući njihovoj sposobnosti da prežive ekstremne uvjete pH mogu opstati u gastrointestinalnom traktu čovjeka te tako sudjelovati u zaštiti stanice u stresnim uvjetima. Niska pH-vrijednost u želucu djelomično inhibira djelovanje probiotičkih bakterija, ali mogućnost preživljavanja u takvim uvjetima im pruža prisutnost S-sloja. Prisutnost S-sloja doprinosi stabilnosti u preživljavanju niskih pH vrijednosti probiotičkih sojeva primjenjenih u ljudi i tako održava minimalno potrebnu koncentraciju probiotičkih stanica da se izazove pozitivan zdravstveni učinak na čovjeka. Proučavanje utjecaja S-proteina prisutnih u pojedinim sojevima BMK omogućava nam bolju predodžbu o pozitivnim djelovanjima probiotičkih bakterija. S time na umu, probiotici bi se mogli sve više koristiti u prehrani ljudi kako bi se izbjegle razne bolesti gastrointestinalnog trakta što bi konačno moglo dovesti i do zamjene antibiotika sa probioticima.

S-proteini sudjeluju u održavanju crijevnog integriteta raznim mehanizmima od kojih nisu svi potpuno razjašnjeni. Poznat je mehanizam kojim se S-proteini, nakon agregacije, vežu na epitelne stanice i druge strukture gastrointestinalnog trakta te tako onemogućuju pristup stranim mikroorganizmima bazalnoj membrani i ekstracelularnom matriksu, čime se posljedično sprječava pojava upalnih procesa (Horie i sur., 2002). Eksperimentalno, utjecaj S-proteina se ispituje tako da se uspoređuje učinak pojedinog probiotičkog svojstva stanica sojeva koji eksprimiraju proteine S-sloja sa stanicama istih sojeva s čije je površine uklonjen sloj S-proteina.

Hollman i sur. (2007) su dokazali da S-proteini pružaju veću stabilnost sojevima *L. brevis* i *L. kefir* ako su izloženi uvjetima gastrointestinalnog trakta. Frece i sur. (2005) su dokazali da uklanjanjem proteina S-sloja mikroorganizmi postaju osjetljiviji na djelovanje simuliranih sokova gastrointestinalnog trakta, čime se potvrđuje njegova važnost u obrani od stresnih okolišnih uvjeta. Na pokusima provedenim sa probiotičkim sojem *L. helveticus* M92 utvrdili su da su proteini S-sloja osjetljivi na proteinazu K, ali ne i na pepsin (sastojak želuca) i pankreatin (sastojak tankog crijeva). Kako bi se utvrdila zaštitna uloga S-proteina *Lb. brevis* SF9B, provedeno je ispitivanje obnavljanja sloja S-proteina nakon izlaganja stanica tog soja

simuliranim uvjetima gastrointestinalnog trakta. Obnavljanje sloja S-proteina praćeno je tijekom 24-satnog uzgoja u MRS bujonu tako da se u određenim razmacima provodila izolacija proteina s površine stanica soja *Lb. brevis* SF9B te su proteinske vrpce vizualizirane SDS-PAGE metodom. Gelovi nakon provedenih elektroforeza prikazani su na slici 5. Na svim gelovima, stupac 1 prikazuje proteine stanica soja *Lb. brevis* SF9B tretirane fosfatnim puferom, koji služe kao kontrolni uzorak budući da pokazuju situaciju u kojoj se stanice nisu prethodno nalazile u stresnim uvjetima. Tijekom 24 sata intenzitet proteinske vrpce koja odgovara S-proteinu tog soja, a koji ima molekulsku masu oko 46 kDa, nije se značajno promijenio. Stupac 2 prikazuje površinske proteine stanica istog soja koje su prethodno bile tretirane simuliranim želučanim sokom. Iz slike gelova možemo zaključiti da simulirani želučani sok nepovoljno djeluje na S-proteine budući da u uzorcima uzetim u 0., 2. i 4. satu nedostaje odgovarajuća proteinska vrpca. U uzorcima uzimanim od 6. sata do 24. sata vrpca je sve uočljivija te iz tog razloga možemo zaključiti da se sloj S-proteina obnavlja. Tretman direktnim prijelazom iz simuliranog želučanog soka u simulirani sok tankog crijeva na S-sloj soja *Lb. brevis* SF9B prikazan je u stupcu 3, a rezultati su istovjetni onima u stupcu 2. Stupac 4 predstavlja proteine stanica soja *Lb. brevis* SF9B tretiranih simuliranim sokom tankog crijeva te su doneseni isti zaključci kao i kod stupaca 2 i 3, s time da se sloj S-proteina počeo obnavljati već u 4. satu. Prema tome, simulirani sok želuca ima jači nepovoljni učinak na sloj S-proteina stanica ispitivanog soja. Konačno, dobiveni rezultati slažu se s onima opisanim u Frece i sur. (2005). Dodatno, budući da stanice ispitivanog soja neposredno nakon izlaganja nepovoljnim uvjetima koriste svoje resurse da obnove sloj S-proteina, možemo zaključiti da su S-proteini od iznimno velike važnosti za fiziološku aktivnost stanica sojeva koji ih eksprimiraju.





**Slika 5.** Gelovi nakon SDS-PAGE proteina izoliranih s površine stanica soja *Lb. brevis* SF9B tijekom 24-satnog uzgoja u MRS bujonu nakon tretiranja stanica simuliranim sokovima gastrointestinalnog trakta; uzorci proteina su izolirani u a) 0. i 2., b) 4. i 6. te c) 22. i 24. satu.

S – standard proteina poznatih molekulskih masa;

1 – soj *Lb. brevis* SF9B tretiran fosfatnim puferom (kontrola)

2 - soj *Lb. brevis* SF9B tretiran simuliranim želučanim sokom

3 - soj *Lb. brevis* SF9B tretiran direktnim prijelazom iz simuliranog želučanog soka u simulirani sok tankog crijeva

4 - soj *Lb. brevis* SF9B tretiran simuliranim sokom tankog crijeva

#### 4.2. Kompetitivna ekskluzija s predinkubacijom bakterije mliječne kiseline *Lb. brevis* SF9B

*Lactobacillus* vrste su izolirane iz dijelova gastrointestinalnog trakta čovjeka i od tada postoji veliki interes za njihovo istraživanje i primjenu, zbog tvrdnji o blagotvornom učinku na zdravlje domaćina. Laktobacili su najvažniji sudionici uravnotežene crijevne mikroflore, a proučavanje mehanizama pomoću kojih koloniziraju intestinalni trakt pomaže u razumijevanju utjecaja uravnotežene mikroflore na zdravlje domaćina.

*In vivo* istraživanja mehanizama kojima se bakterije vežu na površinu crijevnih stanica su vrlo zahtjevna, stoga su razvijeni *in vitro* modeli pomoću kojih se istražuje adhezija bakterija na humane epitelne crijevne stanice. Razvijen je velik broj staničnih linija humanog adenokarcinoma, koje posjeduju svojstva različitih tipova stanica tkiva crijevnog epitela. Jedna od staničnih linija koja se koristi u istraživanjima adhezije bakterija je Caco-2 stanična linija (Fogh i sur., 1977; Pinto i sur., 1983). Caco-2 stanice eksprimiraju proteinske markere koji su jednaki onima koje eksprimiraju stanice crijevnih resica i stoga imaju vrlo važnu ulogu u istraživanju adhezije BMK.

Greene i Klaenhammer su 1994. godine provodili istraživanje u kojem su htjeli dokazati ulogu S-proteina u adheziji na Caco-2 stanice koristeći sojeve *Lactobacillus acidophilus* BG2FO4 i NCFM/N2. Njihovi rezultati su pokazali da S-proteini koji se ekprimiraju na površini ispitivanih sojeva ne utječu na adheziju na Caco-2 stanice. S-proteini eksprimirani na površini ovih sojeva su slični, ali ne i identični S-proteinima koji se nalaze na površini drugih laktobacila te se pretpostavilo da na adheziju ovih sojeva na Caco-2 stanice utječu druge komponente prisutne na površini proteina. Stoga je u ovom radu ispitana uloga S-proteina, koji eksprimira soj *Lactobacillus brevis* SF9B, u adheziji test-mikroorganizma *Staphylococcus aureus* 3048 na Caco-2 staničnu liniju (Slika 6).

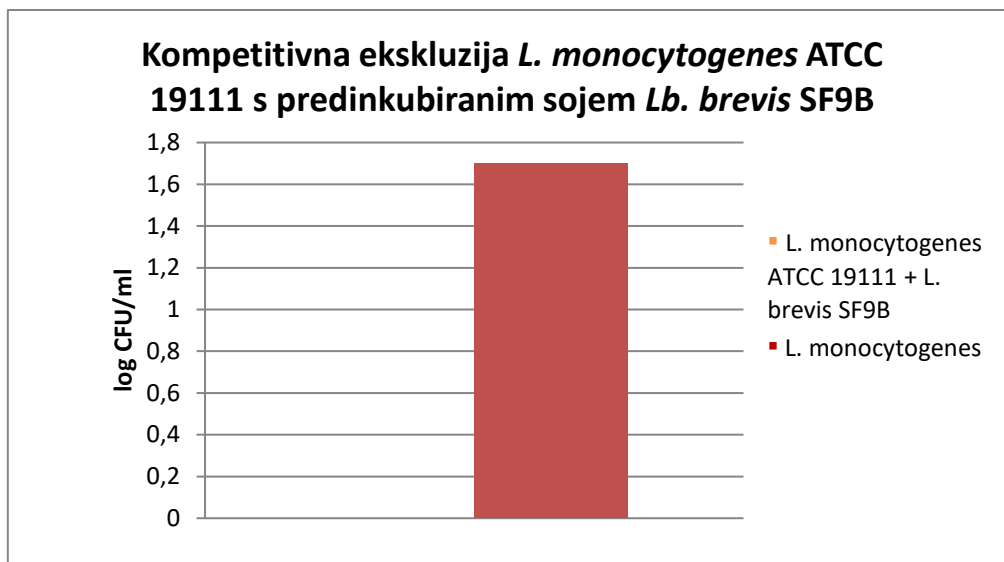
Ključan faktor u preživljavanju i kolonizaciji bakterija u gastrointestinalnom traktu je adhezija na crijevne epitelne stanice. Za patogene bakterije, adhezija na epitel je kritičan korak, sve dok otpuštanje enzima i toksina inicira nekrotični proces direktno u ciljanu stanicu čime se olakšava invazija. Epitelne stanice gastrointestinalnog trakta su zaštićene od patogenih bakterija mnogim mehanizmima. Jedan od njih je redukcija infekcija izazvanih patogenima kompeticijom prisutne mikrobiote za vezna mjesta u ekosustavu i izlučivanje komponenti koje imaju antimikrobnu aktivnost (Ouweland i sur., 2003; Baccigalupi i sur., 2005).

Caco-2 stanice, osim što se koriste za proučavanje mehanizama pomoću kojih se bakterije koje čine uravnoteženu crijevnu mikrofloru adheziraju na crijevne epitelne stanice, imaju vrlo važnu ulogu u istraživanju mehanizama koji su odgovorni za interakcije patogenih

bakterija i bakterija mliječne kiseline koje konkuriraju za isti ekosustav. Neke od patogenih bakterija koje konkuriraju crijevnoj mikroflori za vezanje na Caco-2 stanice su *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes*, enteropatogene i enterotoksične *Escherichia coli* i *Vibrio cholerae*. Kompetitivna ekskluzija je pojam koji označava svojstvo pojedinih bakterija da spriječe adheziju nepoželjnih mikroba u probavnom sustavu. Kako bi se ispitala kompetitivna ekskluzija s predinkubacijom probiotičkog soja *Lactobacillus brevis* SF9B, korištene su suspenzije test-mikroorganizama *Listeria monocytogenes* ATCC 19111 (Slika 6) i *Staphylococcus aureus* 3048 (Slika 7).

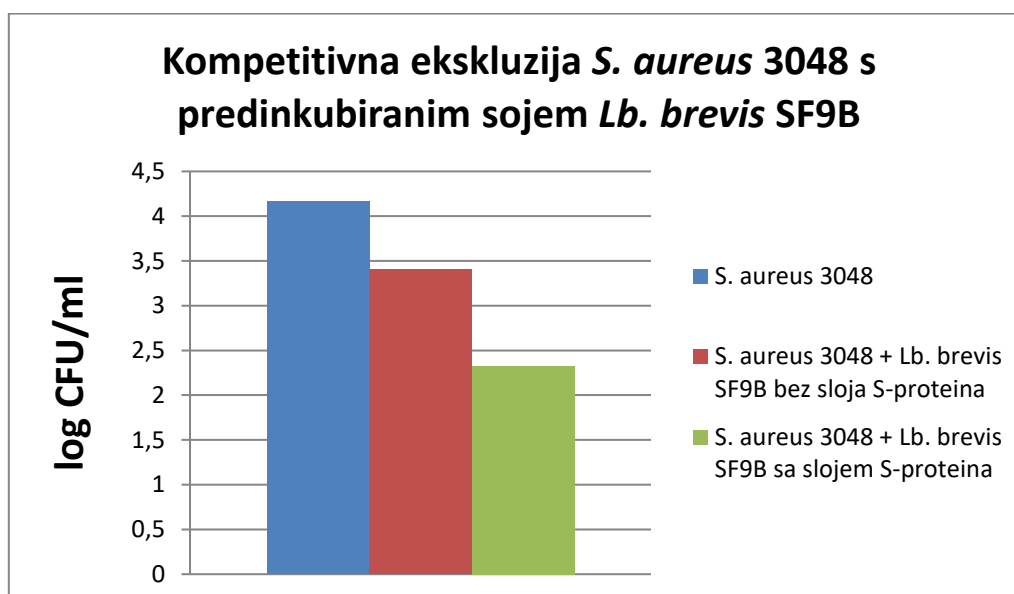
Slika 6 ukazuje da nije došlo do adhezije test-mikroorganizma *L. monocytogenes* ATCC 19111 na Caco-2 stanice nakon predinkubacije sojem *L. brevis* SF9B, dok je adhezija ispitnog test-mikroorganizma na Caco-2 stanice bez prisutnosti soja *Lb. brevis* SF9B bila uspješna. Prema tome, došlo je do kompetitivne ekskluzije test-mikroorganizma *L. monocytogenes* ATCC 19111 sojem *Lb. brevis* SF9B.

Na slici 7 prikazana je adhezija test-mikroorganizma *St. aureus* 3048, koja je bila smanjena u slučaju kad su na Caco-2 stanicama predinkubirane stanice soja *Lb. brevis* SF9B, što upućuje na uspješnu kompetitivnu ekskluziju navedenog test-mikroorganizma ispitivanim probiotičkim sojem. Dodatno, prilikom provođenja eksperimenta kompetitivne ekskluzije sa stanicama probiotičkog soja kojima su prethodno uklonjeni S-proteini, efekt smanjenja adhezije stanica test-mikroorganizma je bio manji. Prema tome, sloj S-proteina osigurava bolju kompetitivnu ekskluziju patogenih bakterija, budući da ima ulogu u adheziji stanica koje ga eksprimiraju. Naime, bolja adhezija stanica probiotičkih sojeva uzrokuje manju mogućnost vezanja patogenih bakterija, budući da adhezirane stanice probiotičkog soja zauzimaju više receptora na Caco-2 stanicama koji su neophodni za uspješno vezanje na tu staničnu liniju. Također, veći broj adhezirane stanice soja *Lb. brevis* SF9B antagonistički djeluje na stanice test-mikroorganizma zbog sniženja pH okoline uslijed nakupljanja organskih kiselina, vodikovog peroksida i diacetila te proizvodnje bakteriocina.



**Slika 6.** Kompetitivna ekskluzija test-mikroorganizma *L. monocytogenes* ATCC 19111 s predinkubiranim sojem *Lb. brevis* SF9B

- adhezija test-mikroorganizma *L. monocytogenes* ATCC 19111 s predinkubiranim sojem *Lb. brevis* SF9B
- adhezija test-mikroorganizma *L. monocytogenes* ATCC 19111 (kontrola)



**Slika 7.** Kompetitivna ekskluzija test-mikroorganizma *S. aureus* 3048 s predinkubiranim sojem *Lb. brevis* SF9B

- adhezija test-mikroorganizma *S. aureus* 3048 (kontrola)
- adhezija test-mikroorganizma *S. aureus* 3048 s predinkubiranim sojem *Lb. brevis* SF9B bez sloja S-proteina
- adhezija test-mikroorganizma *S. aureus* 3048 s predinkubiranim sojem *Lb. brevis* SF9B sa slojem S-proteina

## 5. ZAKLJUČCI

1. Sloj S-proteina soja *Lb. brevis* SF9B obnavlja se neposredno nakon izlaganja stanica tog soja simuliranim uvjetima gastrointestinalnog trakta, što ukazuje na veliku važnost S-proteina stanica *Lactobacillus* sojeva koji ih ekspimiraju.
2. Stanice soja *Lb. brevis* SF9B imaju svojstvo kompetitivne ekskluzije test-mikroorganizama *Listeria monocytogenes* ATCC 19111 i *Staphylococcus aureus* 3048 u *in vitro* uvjetima koristeći Caco-2 staničnu liniju, kojem pozitivno doprinose S-proteini prisutni na površini stanica ispitanog probiotičkog soja.

## 6. LITERATURA

1. Åvall-Jääskeläinen S., Hynönen U., Ilk N., Pum D., Sleytr U. B., Palva A. (2008) Identification and characterization of domains responsible for self-assembly and cell wall binding of the surface layer protein of *Lactobacillus brevis* ATCC 8287. *BMC Microbiol.* **8**: 165.
2. Åvall-Jääskeläinen S., Palva A. (2005) *Lactobacillus* surface layers and their applications. *FEMS Microbiol Rev.* **29**: 511–529.
3. Baccigalupi L., Di Donato A., Parlato M., Luongo D., Carbone V., Rossi M., Ricca E., De Felice M. (2005) Small surface-associated factors mediate adhesion of a food-isolated strain of *Lactobacillus fermentum* to Caco-2 cells. *Microbiology* **156**: 830–836.
4. Bron P., Kleerebezem M., Brummer R., Cani P., Mercenier A., MacDonald T., Garcia-Rodenas C.L., Wells J. M. (2017) Can probiotics modulate human disease by impacting intestinal barrier function? *British Journal of Nutrition* **117(1)**: 93-107.
5. Chen X., Xu J., Shuai J., Chen J., Zhang Z., Fang W. (2007) The S-layer proteins of *Lactobacillus crispatus* strain ZJ001 is responsible for competitive exclusion against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella typhimurium*. *International Journal of Food Microbiology* **115**: 307–312.
6. Corfield A.P., Myerscough N., Longman R., Sylvester P., Arul S., Pignatelli M. (2000) Mucins and Mucosal Protection in the Gastrointestinal Tract: New Prospects for Mucins in the Pathology of Gastrointestinal Disease. *Gut* **47**: 589-594.
7. Fogh J., Fogh J. M., Orfeo T. (1977) One hundred and twenty-seven cultured human tumor cells lines producing tumors in nude mice. *Journal of the National Cancer Institute* **59**: 221–226.
8. Food and Agriculture Organization/World Health Organization (2002) Joint FAO/WHO working group report on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food, London, ON, Canada.
9. Frece J., Kos B., Svetec I.K., Zgaga Z., Mrša V., Šušćković J. (2005) Importance of S-layer proteins in probiotic activity of *Lactobacillus acidophilus* M92. *Journal of Applied Microbiology* **98**: 285-292.
10. Freter R., Stauffer E., Cleven D. (1983) Continuous flow cultures as *in vitro* models of the ecology of large intestinal flora. *Infection and Immunity* **39**: 666-675.
11. Fuller R. (1989) Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology* **66**: 365-378.



12. Garrote G.L., Delfederico L., Bibiloni R., Abraham A.G., Pérez P.F., Semorile L., De Antoni G.L. (2004) Lactobacilli isolated from kefir grains: Evidence of the presence of S-layer proteins. *Journal of Dairy Research* **71**: 222-230.
13. Gotteland M., Cruchet S., Verbeke S. (2001) Effect of *Lactobacillus* ingestion on the gastrointestinal mucosal barrier alterations induced by indometacin in humans. *Aliment Pharmacol Ther* **15**: 11–17.
14. Greene J. D., Klaenhammer T.R. (1994) Factors involved in adherence of lactobacilli to human Caco-2 cell. *Applied and Environmental Microbiology* **60**: 4487-4494.
15. Havenaar R., Huis in't Veld J.H.J. (1992) Probiotics: A General View. U: The Lactic Acid Bacteria in Health and Disease, 3. izd., Wood B.J.W., ur., Elsevier Applied Science, str. 151-170.
16. Hermiston M.L., Gordon J.I. (1995) Inflammatory bowel disease and adenomas in mice expressing a dominant negative N-cadherin. *Science* **270**: 1203–1207.
17. Hill C., Guarner F., Reid G., i sur. (2014) Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology* **11**: 506–514.
18. Hollmann A., Delfederico L., Glikmann G., De Antoni G.L., Semorile L., Disalvo A. (2007) Characterization of liposomes coated with Slayer proteins from lactobacilli. *Biochimica et Biophysica Acta* **1768**: 393-400.
19. Horie M., Ishiyama A., Fujihira-Ueki Y., Sillanpää J., Korhonen T.K., Toba T. (2002) Identification of *Lactobacillus crispatus* by polymerase chain reaction targeting S-layer protein gene. *Journal of Applied Microbiology* **92**: 396-403.
20. Hynönen U., Palva A. (2013) *Lactobacillus* surface layer proteins: Structure, function and applications. *Appl Microbiol Biotechnol* **97(12)**: 225-243.
21. Hynönen U., Westerlund-Wikström B., Palva A., Korhonen T.K. (2002) Identification by flagellum display of an epithelial cell- and fibronectin-binding function in the S1pA surface protein of *Lactobacillus brevis*. *Journal of Bacteriology* **184**: 3360-3367.
22. Jakava-Viljanen M., Avall-Jääskeläinen S., Messner P., Sleytr U.B., Palva A. (2002) Isolation of three new surface layer protein genes (slp) from *Lactobacillus brevis* ATCC 14869 and characterization of the change in their expression under aerated and anaerobic conditions. *Journal of Bacteriology* **184**: 6786-6795.
23. Johansson M.E.V., Larsson J.M.H., Hansson G.C. (2011) The two mucus layers of colon are organized by the MUC2 mucin, whereas the outer layer is a legislator of host-microbial interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**: 4659–4665.

24. Karczewski J., Troost F.J., Konings I., i sur. (2010) Regulation of human epithelial tight junction proteins by *Lactobacillus plantarum* *in vivo* and protective effects on the epithelial barrier. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **298**: G851–G859.
25. Kennedy M. J., Volz P.A. (1985a) Effect of various antibiotics on gastrointestinal colonisation and dissemination by *Candida albicans*. *Sabourandia* **23**: 265-273.
26. Kennedy M. J., Volz P.A. (1985b) Ecology of *Candida albicans* gut colonization: inhibition of *Candida* adhesion, colonization, and dissemination from gastrointestinal tract by bacterial antagonism. *Infection and Immunity* **49**: 654-663.
27. Kleerebezem M., Hols P., Bernard E., Rolain T., Zhou M., Siezen R. J., Bron P. A. (2010) The extracellular biology of the lactobacilli. *FEMS Microbiol Rev* **34**: 199–230.
28. Kos B. (2001) Probiotički koncept: *in vitro* istraživanja s odabranim bakterijama mliječne kiseline. *Disertacija*. Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu.
29. Kos B., Šušković J., Vuković S., Šimpraga M., Frece J., Matošić S. (2003) Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. *Journal of Applied Microbiology* **94**: 981-987.
30. Mack D.R., Ahrne S., Hyde L., Wei S., Hollingsworth M.A. (2003) Extracellular MUC3 Mucin Secretion Follows Adherence of *Lactobacillus* Strains to Intestinal Epithelial Cells *in vitro*. *Gut* **52**: 827-833.
31. Mack D.R., Michail S., Wei S., McDougall L., Hollingsworth M.A. (1999) Probiotics Inhibit Enteropathogenic *E. coli* Adherence *in vitro* by Inducing Intestinal Mucin Gene Expression. *American Journal of Physiology* **276**: G941-G950.
32. Moal V.L.-L., Servin A.L. (2006) The Front Line on Enteric Host Defence against Unwelcome Intrusion of Harmful Microorganisms: Mucins, Antimicrobial Peptides and Microbiota. *Clinical Microbiology Reviews* **19**: 315- 337.
33. Mobili P., Gerbino E. E., Tymczyszyn E., Gómez-Zavaglia A. (2010) S-layers in lactobacilli: structural characteristics and putative role in surface and probiotic properties of whole bacteria U: *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, Méndez-Vilas, A. (ured.). Formatex Research Center, Badajoz, Spain, str. 1224-1234.
34. Obradović D., predavanje iz predmeta Tehnološka mikrobiologija, akademska godina 2002/03), <http://www.sirikajmak.rs/documents/predavanja-tehn-mikrobiologija.pdf>, pristupljeno 08.06.2017.

35. Ouwehand A. C., Salminen S., Roberts P. J., Ovaska J., Salminen, E. (2003) Disease-dependent adhesion of lactic acid bacteria to the human intestinal mucosa. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* **10**: 643-646.
36. Pinto M., Robine-Léon S., Appay M. D., Keding M., Triadou N., Dussaulx E., Lacroix B., Simon-Assmann P., Haffen K., Fogh J. Zweibaum A. (1983) Enterocyte-like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture. *Biology of the Cell* **47**: 323-330.
37. Quinto E.J., Jimenez P., Caro I., Tejero J., Mateo J., Girbes T. (2014) Probiotic Lactic Acid Bacteria: A Review. *Food and Nutrition Sciences* **5**: 1765-1775.
38. Rowland J. R. (1992) Metabolic interactions in the gut. U: Probiotics - The Scientific basis, Fuller R., ur., Chapman and Hall, London, str. 29-53.
39. Salminen S., Isolauri E., Salminen E. (1996) Clinical uses of probiotics for stabilizing the gut mucosal barrier: successful strains and future challenges. *Antoine van Leeuwenhoek* **70**: 347-358.
40. Sára M., Sleytr U. (2000) S-layer proteins. *J Bacteriol* **182(4)**: 859-868.
41. Sleytr U., Schuster B., Egelseer E.-M., Pum D. (2014) S-layers: principles and applications. *FEMS Microbiol Rev* **38(5)**: 823–864.
42. Šušković J. (1996) Rast i probiotičko djelovanje odabranih bakterija mliječne kiseline. *Disertacija*. Prehrambeno-biotehnološki fakultet u Zagrebu.
43. Šušković J., Brkić B., Matošić S. (1997) Mehanizam probiotičkog djelovanja bakterija mliječne kiseline. *Mljekarstvo* **47(1)**: 57-73.
44. Šušković J., Kos B., Beganović J., Leboš Pavunc A., Habjanič K. (2010) Antimicrobial Activity – the Most Important Property of Probiotic and Starter Lactic Acid Bacteria. *Food Technology Biotechnology* **48(3)**: 296-307.
45. Šušković J., Kos B., Goreta J., Matošić S. (2001) Role of lactic acid bacteria and bifidobacteria in synbiotic effect. *Food Technol. Biotechnol.* **39**: 227-235.
46. Šušković J., Kos B., predavanja iz predmeta Biotehnologija 4, akademska godina 2016./2017., [http://moodle.srce.hr/2016-2017/pluginfile.php/978791/mod\\_resource/content/1/biotehnologija%204\\_2016\\_5web.pdf](http://moodle.srce.hr/2016-2017/pluginfile.php/978791/mod_resource/content/1/biotehnologija%204_2016_5web.pdf), pristupljeno 10.06.2017.
47. Šušković J., Kos B., predavanja iz predmeta Biotehnologija 4, akademska godina 2016./2017., [http://moodle.srce.hr/2016-2017/pluginfile.php/978791/mod\\_resource/content/1/biotehnologija%204\\_2016\\_5web.pdf](http://moodle.srce.hr/2016-2017/pluginfile.php/978791/mod_resource/content/1/biotehnologija%204_2016_5web.pdf), pristupljeno 10.06.2017.

48. Tallon R., Arias S., Bressollier P., Urdaci M.C. (2007) Strain- and matrix-dependent adhesion of *Lactobacillus plantarum* is mediated by proteinaceous bacterial compounds. *Journal of Applied Microbiology* **102**: 442-451.
49. Tuomola E.M., Ouwehand A.C., Salminen S.J. (1999) Human ileostomy glycoproteins as a model for small intestinal mucus to investigate adhesion of probiotics. *Letters in Applied Microbiology* **28**: 159-163.
50. Van der Sluis M., De Koning B.A.E., de Bruijn A.C.J.M., et al. (2006) Muc2-deficient mice spontaneously develop colitis, indicating that MUC2 is critical for colonic protection. *Gastroenterology* **131**: 117–129.
51. Zoetendal E.G., Rajilić-Stojanović M., Vos W.M. (2008) High-throughput diversity and functionality analysis of the gastrointestinal tract microbiota. *Gut* **57(11)**: 1605–1615.

## Izjava o izvornosti

Izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mogeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

---

ime i prezime studenta